

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-128299

(43)Date of publication of application : 10.05.1994

(51)Int.Cl.

C07K 15/14

A61K 39/395

G01N 33/574

(21)Application number : 04-278498

(71)Applicant : NODA WAX:KK

(22)Date of filing : 16.10.1992

(72)Inventor : AKIYAMA TORU

MORIYAMA MASATANE

TOYOSHIMA KUMAO

(54) ANTIBODY TO PRODUCT OF CANCER SUPPRESSING GENE WT

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an antibody to a product of a cancer suppressing gene WT utilizable for diagnosing cancer or tumor.

CONSTITUTION: The antibody to a product of a cancer suppressing gene WT is an amino acid sequence of a part presumed to have high antigenicity in an estimated structure related to a cancer suppressing gene WT of Wilms tumor. This is an antibody obtained by using a combination of a peptide capable of coding

CysHisGlnArgAsnMetThrLysLeuGlnLeuAlaLeu with a carrier protein as an antigen. The immunoglobulin class is IgG and its molecular weight is about 150000. The molecular extinction coefficient [E1% (1cm), (280nm)] is 1.40. The chain length of the peptide used as the antigen is short. Thereby, its synthesis is readily carried out. A desired antibody can be prepared by a well-known technique itself including the synthesis of this antigenic peptide.

【発行国】

日本国特許庁（J P）

【公報種別】

(19)日本国特許庁（J P）

(12) 公 開 特 許 公 報（A）

(11)特許出願公開番号

特開平6－128299

(43)公開日 平成 6 年(1994) 5 月10日

公開特許公報（A）

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 15/14		8517－4H		
A 6 1 K 39/395	T	9284－4C		
	E	9284－4C		
G 0 1 N 33/574	Z	9015－2 J		

【公開番号】

特開平 6－1 2 8 2 9 9

審査請求 未請求 請求項の数 1（全 4 頁）

(21)出願番号	特願平4－278498	(71)出願人	000155506 株式会社野田ワックス 神奈川県愛甲郡愛川町中津7202	
【公開日】	(22)出願日	平成 4 年(1992)10月16日	(72)発明者	秋 山 徹 大阪府箕面市小野原東 3 丁目 4 番 3－301 号
平成 6 年（1 9 9 4）5 月 1 0 日			(72)発明者	守 山 正 胤 東京都世田谷区等々力 7 丁目 2 番 25 号
			(72)発明者	豊 島 久 真 男 大阪府茨木市美穂ガ丘19番 C－1102 号
【発明の名称】		(74)代理人	弁理士 佐々木 功 （外 1 名）	

癌抑制遺伝子 WT の産物に対する抗体

(54)【発明の名称】 癌抑制遺伝子 WT の産物に対する抗体

【国際特許分類第 5 版】

(57)【要約】

【目的】 癌抑制遺伝子 WT の産物に対する抗体を提供

C07K 15/14する。 8517-4H

【構成】 Wilms 腫瘍の癌抑制遺伝子 WT に関する推定

A61K 39/39構造において抗原性が高いものと推定される部分のアミノ酸配列である

Cys His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu

G01N 33/57をコードするペプチドとキャリアー蛋白との結合物を抗原として得られる抗体である。

【審査請求】≡【効果】 抗原として用いるペプチドの鎖長が短く、従ってその合成が容易であり、この抗原性ペプチドの合成

【請求項の数を含めて自体周知の手法により所望の抗体を調製することができ、本発明による抗体は癌や腫瘍の診断に利用す

【全頁数】 4 ることができる。

【出願番号】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミノ酸配列が

Cys-His-Gln-Arg-Asn-Met-Thr-Lys-Leu-Gln-Leu-Ala-Leu

である抗原性ペプチドとキャリアー蛋白との結合物を抗原として得られる抗体であって、免疫グロブリンクラスが IgG、分子量が約 150000、分子吸光係数 $[E]^{1\%}(1\text{cm})$ 、(280nm) が 1.40 であることを特徴とする、癌抑制遺伝子 WT の産物に対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は抗体に係り、殊に癌抑制遺伝子 WT の産物に対する抗体に係るものであり、癌及び腫瘍の診断に利用することができる。

【0002】

【従来の技術】正常細胞と癌細胞とを融合させることにより得られるハイブリドーマは正常細胞と変わらない形値を示すこと並びに網膜芽細胞腫、Wilms 腫瘍、神経芽細胞腫等の遺伝性腫瘍においては染色体の特定部位に異常が認められるので、遺伝性腫瘍の発生には癌抑制遺伝子の異常が関与しているものと考えられてきた。事実、分子生物学の進歩により、最近になって遺伝性腫瘍である網膜芽細胞腫、Wilms腫瘍等に関する癌抑制遺伝子が次々とクローニングされ、その構造が明らかにされ、当該遺伝子における異常が確認されるに至っている。更に、現在では上記の遺伝性腫瘍のみならず肺癌、乳癌、胃癌、大腸癌等の一般的な腫瘍の発生に関しても癌抑制遺伝子の異常が重要な役割を果たしていることが解明されつつある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題乃至発明の目的】上記の従来技術に鑑みて、癌や腫瘍の発生を解明するためには癌抑制遺伝子、殊にその産物に関する研究が肝要である。従って、本発明の目的は癌抑制遺伝子の産物に対する抗体を提供し、これによって各種の癌や腫瘍の発生に関する研究を発展させ、延いては癌や腫瘍の診断に利用する途を開くことにある。

【0004】

【課題を解決し目的を達成する手段及び作用】本発明によれば、上記の課題はアミノ酸配列が

Cys-His-Gln-Arg-Asn-Met-Thr-Lys-Leu-Gln-Leu-Ala-Leu

である抗原性ペプチドとキャリアー蛋白との結合物を抗原として得られる抗体であって、免疫グロブリンクラスが IgG、分子量が約 150000、分子吸光係数 $[E]^{1\%}(1\text{cm})$ 、(280nm) が 1.40 であることを特徴とする、癌抑制遺伝子WT の産物に対する抗体により解決されると共に、上記の目的が達成される。

【0005】本発明において、抗原性ペプチドとして特定の上記アミノ酸配列を有するペプチドが採択された理

由は、Wilms 腫瘍に関する癌抑制遺伝子 WT の推定構造の一部であって、抗原性が高い部分であると推定されたからである。この抗原性ペプチドと結合させるべきキャリアー蛋白としては各種のものをを用いることができ、例えばキーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン等を例示することができる。抗原性ペプチドとキャリアー蛋白との結合は自体公知の手法にて、例えばサクシンイミドを用いる方法 [T. Kitagawa 等「J. Biochem.」第 79 巻、第 233 頁(1976 年)] にて行うことができる。

【0006】得られた結合物は、抗原として、免疫目的でマウス、ウサギ、ラット、ヒツジ等の動物に慣用の方法で投与される。免疫した動物から本発明による抗体を得る方法としても慣用の手法を採用することができる。例えば、免疫した動物から採血し、常法に従い抗血清を調製することにより行うことができ [この場合における抗体の存否の判定は癌抑制遺伝子 WT を発現している細胞、例えばヒト赤芽球症細胞株 K-562 を可溶化させ、上記の抗血清を用いウエスタンブロット法により解析し、癌抑制遺伝子 WT の産物 (分子量 55000) が検出されるか否かにより行うことができる]、又免疫した動物のリンパ球を採取しミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを調製し、スクリーニングにより抗体を特異的に産生するハイブリドーマを特定し、該抗体産生ハイブリドーマを培養することによりモノクローナル抗体として得ることができる。尚、上記の抗体産生ハイブリドーマを動物に移植して抗体を産生させ、次いで採血等により採取し単離することによっても所望の抗体を得ることができる。

【0007】

【実施例等】次に、抗体の製造例、確認試験例等により本発明を更に詳細に且つ具体的に説明する。

【0008】製造例

(A) 抗原性ペプチドの調製

Wilms 腫瘍に関する癌抑制遺伝子 WT の産物について既に報告されている推定構造を検討し、抗原性が高い部分と推定されるペプチドであって、下記のアミノ酸配列を有するペプチドを、自動ペプチド合成装置 (ベックマン社製の 990B型) により、固相法で合成した。

Cys-His-Gln-Arg-Asn-Met-Thr-Lys-Leu-Gln-Leu-Ala-Leu

上記の合成ペプチドを 0°C において 30 分間にわたり 75% 弗化水素/25% アニソールで処理することにより固相から剥離させ、1mM ジチオスライトール含有 0.05M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.0) により平衡化させ、SP セファデックスカラム (2.5 x 50cm) に吸着させた。上記の平衡化用緩衝液 500ml と 1mM ジチオスライトール含有 0.5M 酢酸 (pH 7.0) 500ml とのグラジェントにより上記カラム内の吸着物を分画溶出させた。各画分をフルオロレスカミンにてチェックすることによりペプチ

ド含有画分を集めて濃縮し、この濃縮物を、30% 酢酸溶液で平衡化したセファデックス G-10 カラム (1.0 x 50 cm) に吸着させ、上記と同様にしてペプチド含有画分を集めて濃縮し、乾固させることにより所望の抗原性ペプチドを得た。このペプチドを 1N 塩酸溶液に 120°C で一晩浸漬して加水分解させ、アミノ酸分析装置によりアミノ酸組成を調べた結果は下記の通りであった。

Cys 0.9; His 1.0; Gln 2.0; Arg 1.1; Asn 0.9; Met 1.0; Thr 1.0; Lys 0.9; Leu 1.9; Ala 1.0 (%)

【0009】(b) 抗原の調製 (キャリアー蛋白との結合)

10mg/ml の割合で 10mM 磷酸緩衝液に溶解させたキーホールリンペットヘモシアニンと、15mg/ml の割合で 10mM 磷酸緩衝液に溶解させた n-マレイミド-n-ヒドロキシサクシンイミドエステル 63 μ l とを混合し、室温下に 30 分間保持して反応させた。0.1M 磷酸緩衝液 (pH 6.0) により平衡化させたセファデックス G-25 カラムを用い 4°C の温度条件下で、上記の反応液をクロマトグラフィーすることによりキーホールリンペットヘモシアニンを活性化させた。この活性化キーホールリンペットヘモシアニン 2.3ml と、10mg/ml の割合で 10mM 磷酸緩衝液 (pH 7.3) に既述の (a) 項で得た抗原性ペプチドを溶解させた溶液に 5mM EDTA を添加した溶液 0.1ml とを混合し、pH を 6.5 に調整し、次いで室温下で 4 時間混合することにより所望の抗原 (抗原性ペプチドと、キャリアー蛋白であるキーホールリンペットヘモシアニンとの結合物) を得た。この結合物が生成したことは、SDS-ゲル電気泳動解析により確認された。

【0010】(c) 抗体の調製

上記の (b) 項で得た抗原 200 μ g をフロインドの完全アジュバンドと共にウサギの手掌部に注射投与した。その後、更に、3 週間間隔で抗原を 200 μ g 宛 4回皮下に注射投与することにより免疫を施した。最終投与から 10 日目に採血し、血清を分取した。この血清を遠心 (10000 x g) して得た上清に飽和硫酸溶液 (pH 7.4) を添加して硫酸濃度を 14% にした。この溶液を氷冷下で一晩攪拌した後に 10000 x g にて 10 分間遠心して沈澱物を採取した。得られた沈澱物を蒸留水に溶解させ、500 倍量の 0.15M NaCl に対して 48 時間透析処理して抗血清溶液を得た。

【0011】10mM 磷酸緩衝液 (pH 7.2) により平衡化させた DEAE-セルロース (ワットマン DE32) カラム (1.5 x 15cm) に上記の抗血清溶液 2ml を流し、素通り画分として免疫グロブリン IgG 画分を得た。この IgG の収量は 24mg である。集められた IgG を 0.1M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) により透析処理した。一方、活性化 CH-セファロース 4B (ファルマシア社製) 1g を 0.1M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) 5 μ l に懸濁させ、これに既述の (a) 項で得た抗原性ペプチド 10mg を添加して室温下で 2 時間攪拌することによりペプチド

結合 CH-セファロース 4B を調製してカラム (0.5 x 2.0cm) に入れ、このカラムに上記の透析処理済み IgG 画分をチャージし、0.15M NaCl/0.002M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) により十分に洗浄し、次いでカラムに吸着しているペプチド抗体を 0.17M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.3) により溶出させた。集めた溶出液を 0.15 M NaCl に対して透析処理し、次いで限外濾過することにより所望の IgG 抗体を含有する溶液を 0.5ml 得た。

【0012】確認試験例

(1) 免疫グロブリンクラスの決定

カッセル社製の抗ウサギ IgG 抗体、抗ウサギ IgM 抗体及び抗ウサギ IgA + IgM + IgG 抗体を使用し、オクタロニー法により、上記の製造例により得られた抗体 (癌抑制遺伝子 WT の産物に対する精製抗体) の免疫沈降試験を実施して、その免疫グロブリンクラスを決定した。即ち、1% 寒天ゲルに形成した穴の中心部には上記の 3 種の抗ウサギ抗体を入れ、周囲に形成された穴には、これらの抗ウサギ抗体に対して 1/20 量から 2倍づつ稀釈した製造例による精製抗体を入れ、0°C において一晩放置した後に、形成された沈降線を観察した処、当該精製抗体は抗ウサギ IgG 抗体及び抗ウサギ IgA + IgM + IgG 抗体によって免疫沈降を示していたので、その免疫グロブリンクラスは IgG であることが確認された。

【0013】(2) 分子量の決定

製造例で得た精製抗体の分子量をセファデックス G-100 を用い、ゲル濾過法により決定した。即ち、0.02M 炭酸ナトリウム緩衝液にて平衡化させたセファデックス G-100カラム (1.0 x 100cm) に製造例で得た精製抗体を 1mg チャージし、上記の緩衝液にて展開させ、280nm での吸光度を測定して溶出する蛋白を検出し、分子量マーカ [バイオラッド社製の分子量測定キット (No. 151 - 1901) であってチログロブリン (分子量 670000)、 γ -グロブリン (分子量 158000)、卵白アルブミン (分子量 44000)、ミオグロビン (分子量 17000) 及びビタミン B₁₂ (分子量1350) が予めセットされているもの] における溶出パターンと比較した処、精製抗体の分子量は約 150000 であることが判明した。

【0014】(3) 分子吸光係数

製造例で得た精製抗体 1mg を 1ml の炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) に溶解させ、280nm での吸光度を測定した処、1.40 であった。従って分子吸光係数は E_{1%}^{1cm} = 1.40 となる。

【0015】(4) 免疫特異性

癌抑制遺伝子 WT を発現しているヒト赤芽球症細胞株 K-562 を RIPA 緩衝液 (1% NP-40、0.1% デオキシコール炭酸ナトリウム塩、0.5% NaCl 及び 1mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド及び 50mM トリス塩酸緩衝液を含有、pH7.4) により可溶化させた後に 10000 x g にて 30 分間遠心して上清を採取し、この上清を (Lemml i) レムリの方法に従い 10% SDS-ゲル電気泳動法により

分離した。得られた各分離蛋白を常法によりニトロセルロースフィルタにウエスタンランスファーした後、製造例により得た精製抗体とアルカリフォスファターゼ結合抗ウサギ IgG 抗体（カッペル社製）とを用いて癌抑制遺伝子 WT 産物の検出を行った。その結果、癌抑制遺伝子 WT を発現しているヒト赤芽球症細胞株 K-562 に関しては分子量 55000 の蛋白の存在が確認された。尚、製造例の (a) 項に記載の抗原性ペプチドを添加して抗体を吸収させた後に、上記と同様の試験を行った。分子量 55000 の蛋白を検出することはできなかった。これらの事実は、製造例により得られた抗体が癌抑制遺伝子 WT の産物を特異的に認識するものであることを示している。

【0016】

【発明の効果】本発明による抗体は癌抑制遺伝子の産物

配列

Cys His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu

1

5

10

を特異的に認識する。癌抑制遺伝子は遺伝性の特殊な癌や腫瘍のみならず、一般的な各種の癌や腫瘍の発生に関与するものであることが解明されつつあるので、本発明による抗体は癌や腫瘍の発生解明や診断に利用することが可能である。更に、本発明による抗体は鎖長の短い、従って合成が容易なペプチドを抗原材料とするのみで、他は生物工学分野において自体周知の手法を用いて調製することができ、従って製造が容易である。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成ペプチド